

ПОКАЗАТЕЛИ МЕТОДА ДНК-КОМЕТ В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ И СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ МЫШЕЙ ПРИ ТРИХИНЕЛЛЕЗЕ

Пашинская Е.С., Поляржин В.В., Бекиш В.Я
УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов
медицинский университет»

Введение. Во всём мире на современном этапе рождается большое количество детей с наследственной и врожденной патологией. Не исключением является и Беларусь. Трихинеллёз относится к древнейшим гельминтозным заболеваниям животных и человека, которое распространено на территории Республики. Такие факторы как химические, биологические могут служить причиной возникновения генных, хромосомных и геномных мутаций. К биологическим факторам, помимо вирусов и бактерий, можно отнести воздействие гельминтов. Под влиянием их метаболитов возможны цитогенетические и морфологические изменения эмбриональных клеток [1].

Известно, что личинки *Trichinella spiralis* начинают миграцию с 3-4 дня инвазии. В это время личинки линяют, выделяя метаболиты, а с 20-21 дня оседают в волокнах мышц [3]. Метаболиты личинок *T. spiralis* обладают кластогенным воздействием на соматические клетки костного мозга белых мышей, вызывая вторичные повреждения ДНК за счет увеличения уровней микроядеросодержащих эритроцитов в костном мозге инвазированных животных [1]. Метод щелочного гель-электрофореза изолированных клеток позволил установить, что в клетках костного мозга при миграционной стадии *T. spiralis* повышается уровень апоптотических клеток, обусловленный цитотоксическим эффектом инвазии [1]. Однако, воздействие трихинеллёзной инвазии на эмбриональные клетки практически не изучено.

Цель исследования — изучить генотоксические и цитотоксические эффекты в клетках эмбрионов и костном мозге беременных самок при экспериментальном трихинеллёзе в зависимости от срока заражения.

Материалы и методы. Исследования проводились на 30 самках и 10 самцах белых беспородных мышей массой 20-25 г. в возрасте 3-4 месяцев. Животные содержались в клетках в соотношении 3 самки и 1 самец на протяжении 24 часов. Наступление беременности определялось по наличию сперматозоидов в мазке из влагалища и гиперемии наружных половых органов. Беременные самки были разделены на три группы по 10 животных в каждой. Получение культуры *T. spiralis* проводилось по методу О.-Я.Л. Бекиша и соавт. [2]. Мышам 1 группы (контроль) вводили внутривентально по 0,2 мл крахмального геля. Животных 2-й группы заражали на 1-й день беременности культурой личинок трихинеллы внутривентально в дозе 20 лич. на 1 г. массы тела. Мышей 3-ей группы инвазировали в дозе 20 лич. на 1 г. массы тела на 10-й день беременности. На 14-й день беременности всех самок забивали путем декапитации, после чего производили выделение матки с эмбрионами и бедренных костей. От каждой самки брали по два жизнеспособных плода. Получение клеточных суспензий костного мозга проводили по методу N.P. Singh et al. [5] в модификации B. Hellman et al. [4] и нашими изменениями

Для проведения электрофореза использовалась камера фирмы Sigma. Окрасивание препаратов производилось раствором этидиума бромид. Повреждения молекулы ДНК определяли автоматической программой «CASP v. 1.2.2». В микропрепарате подсчитывалось по 50 клеток. Учитывались такие показатели генотоксичности как: длина «хвоста кометы» (в пикселях); процент ДНК в «хвосте кометы» и «момент хвоста». Так же производился в 100 клетках подсчет апоптотических для оценки цитотоксического воздействия метаболитов личинок *T. spiralis*.

Статистическая обработка результатов велась с помощью программы Excel 2002, производился расчет средней арифметической и ее стандартное отклонение ($M \pm SD$). Достоверность выявленных различий определяли по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В клетках костного мозга контрольных животных длина «хвостов комет» в среднем составила $4,41 \pm 1,52$, процент ДНК в «хвостах комет» – $1,70 \pm 0,55$, «момент хвоста» – $0,11 \pm 0,07$.

При обработке результатов животных зараженных на 1-й день беременности в костном мозге самок на 14-й день длина «хвостов комет» составила $8,51 \pm 3,14$, процент ДНК в «хвостах комет» $4,52 \pm 2,32$, «момент хвоста» $1,09 \pm 0,82$. Показатели генотоксичности превысили контрольные величины, так длина «хвостов комет» – в 1,92 раза, процент ДНК в «хвостах комет» – в 2,6 раза, «момент хвоста» – в 9,9 раза соответственно.

У мышей зараженных на 10-й день беременности в костном мозге контрольные величины превысил только «момент хвоста», который составил $0,58 \pm 0,68$, что было больше показателя контроля в 5,27 раза.

В клетках эмбрионов беременных мышей контрольной группы длина «хвостов комет» составила $3,81 \pm 0,51$; процент ДНК в «хвостах комет» – $1,07 \pm 0,55$; «момент хвоста» комет – $0,10 \pm 0,09$.

У животных зараженных на 1-й день беременности в клетках эмбрионов все показатели генотоксичности превышали контрольные показатели. Так длина «хвостов комет» – в 1,95 раза; процент ДНК в «хвостах комет» – в 3,7 раза, «момент хвоста» – в 11,4 раза.

У животных, зараженных на 10-й день беременности, в эмбриональных клетках исследуемые показатели не отличались от контрольных.

В клетках костного мозга мышей контрольной группы процент апоптотических клеток составил $1,40 \pm 0,70$. У животных, зараженных на 1-й день беременности процент апоптотических клеток был выше в 10,35 раза контрольного, а при заражении на 10-й день беременности – в 15,6 раза.

Контрольный показатель апоптоза в клетках эмбрионов составил $0,60 \pm 0,84$. При заражении мышей культурой личинок *T. spiralis* на 1-й день беременности процент апоптотических клеток превысил контрольный уровень в 12,4 раза, а у животных третьей группы в 9 раз.

Таким образом, максимальное повреждение наследственного аппарата соматических клеток костного мозга и эмбриональных клеток зародышей наблюдается при миграционной стадии личинок *T. spiralis* у инвазированных на 1-й день беременности самок белых беспородных мышей. Это характеризуется более значимыми повышениями всех исследуемых показателей.

Выводы.

1. Миграция личинок *T. spiralis* у мышей, заражённых с 1-го дня беременности, вызывает генотоксический эффект в соматических клетках костного мозга самок и клетках эмбрионов на 14-й день беременности. Это характеризуется увеличением количества одноцепочечных разрывов и щелочно-лабильных сайтов ядерной ДНК в клетках костного мозга и в клетках эмбрионов.

2. Личинки трихинеллы во время миграции обладают цитотоксическим эффектом на клетки костного мозга самок и эмбрионов, который характеризуется ростом процента апоптотических клеток. Наибольшее воздействие наблюдается при заражении мышей на 1-й день беременности.

Литература:

1. Бекиш В.Я. Состояние генома хозяина при гельминтозах / В.Я. Бекиш, О.-Я.Л. Бекиш // Витебск. – Изд. ВГМУ. – 2004. – С. 40–43.
2. Бекиш О.-Я.Л. Экспериментальный трихинеллёз: методы воспроизведения модели / О.-Я.Л. Бекиш, И.И. Бурак, Н.Н. Острейко // Реферат в МРЖ – 1982 - № 12, Т. 3, публ. 3637.
3. Бритов В.А. Возбудители трихинеллёза / В.А. Бритов // Изд. «Наука». – М – 1982 – С. 34–35.
4. Hellman B. Alkaline single cell gel electrophoresis of DNA fragments in biomonitoring for genotoxicity: an introductory study on healthy human volunteers / B. Hellman, H. Vaghef, L. Friis et al // Int Arch/ Occup Environ Health. – 1997 – Vol. 69 – P. 185–192.
5. Singh N. A Simple Technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells / N. Singh, M. McCoy, R. Tice et al // Exp Cell Res - 1988 - Vol. 5 - P. 415–418.